

UNTERSUCHUNGEN ZUR
PROTEOLYTISCHEN AKTIVITÄT VON PROTEASEN
AUS *PROTEUS MIRABILIS*,
CITROBACTER INTERMEDIUS,
STAPHYLOCOCCUS AUREUS HAEMOLYTICUS,
STAPHYLOCOCCUS ALBUS UND
DEREN HEMMBARKEIT DURCH NATÜRLICHE
PROTEASE-INHIBITOREN

Hermann Wunderlich

1977



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552316_0052

AUS DER HALS-, NASEN- UND OHRENKLINIK

DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Direktor: Prof. Dr. H. H. Naumann

UNTERSUCHUNGEN

ZUR PROTEOLYTISCHEN AKTIVITÄT VON PROTEASEN AUS
PROTEUS MIRABILIS, CITROBACTER INTERMEDIUS,
STAPHYLOCOCCUS AUREUS HAEMOLYTICUS, STAPHYLOCOCCUS
ALBUS UND DEREN HEMMBARKEIT DURCH NATÜRLICHE
PROTEASE-INHIBITOREN

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n
zur Erlangung der Doktorwürde in der Zahnmedizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig- Maximilians- Universität zu München

vorgelegt von
Hermann W u n d e r l i c h
aus Großhesselohe

München 1977

Mit Genehmigung

der

Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. K. Hochstrasser

Mitberichterstatter: Prof. Dr. H. H. Naumann

Dekan: Prof. Dr. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 5.8.1977



MEINEN LIEBEN ELTERN GEWIDMET

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

A EINFÜHRUNG

Geschichtliches über die Übertragung von Krankheiten

Allgemeines zur bakteriellen Besiedelung von Körperoberflächen

Flora des Respirationstraktes

- im Bereich des Tracheo-Bronchial-Raumes
- im Bereich des Nasen-Rachen-Raumes und der Nasennebenhöhlen

Das Zusammenleben von Mikro- und Makroorganismen

- allgemeine Faktoren, die für die Aufrechterhaltung eines Gleichgewichts nötig sind
- mögliche Formen eines solchen Zusammenlebens

Auseinandersetzung zwischen parasitär lebenden Keimen und Wirtsorganismus

- Definition von Pathogenität und Virulenz
- Schädigung des Wirts durch Toxin- und Enzymproduktion
- Abwehrleistung des Körpers durch Antikörperbildung und Phagozytose

B HAUPTTEIL

Themastellung

Stellung der Mikroorganismen im System der lebenden Organismen

Unterteilung des Bakterienreiches in zwei Gruppen durch die GRAM - Färbung

Kurze taxonomische Beschreibung der als Proteasenquelle verwendeten Bakterien

- Staphylococcus aureus
- Staphylococcus albus
- Citrobacter intermedius
- Proteus mirabilis

Funktion und Eigenschaften der Proteasen

Inhibitorauswahl

- Gründe
- Definition der natürlichen Proteaseninhibitoren

C EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Untersuchungsmaterialien

- Proteasen
 - Herkunft
 - Gewinnung
- Inhibitoren
 - Serum von Menschen
 - einzelne Seruminhibitoren
 - alpha-1-Antitrypsin
 - alpha-2-Makroglobulin
- Inhibitor der Glandula submandibularis des Hundes
- Polyvalenter Inhibitor aus Rinderorganen
- Pflanzliche Inhibitoren
 - Roggeninhibitor
 - Sojabohneninhibitor
- Inhibitor aus Eiklar

Untersuchungsmethoden

- Bestimmung der Hemmkapazität der Inhibitoren im Antitrypsintest (BAPA)
- Proteasenaktivitätstest mit Azokasein
 - Aktivitätstest bei verschiedenen pH - Werten
- Bestimmung der Hemmkapazität mit Azokasein

D ERGEBNISSE

- Proteolytische Aktivität der Kulturüberstände
- Auswertung der pH - Wert - Änderungen
- Hemmwirkung der Serumverdünnung, die mit dem alpha-2-Makroglobulin-Gehalt korreliert
- Teilhemmung durch Inhibitoren aus Eiklar
- Keine Hemmwirkung der übrigen Inhibitoren
- Verändertes Proteasenspektrum bei Staphylococcus aureus Fraktion II

E DISKUSSION

Vergleich der eigenen Ergebnisse mit bereits bestehenden Untersuchungen über die Funktion natürlicher Proteasen-Inhibitoren

- Hemmmechanismus von alpha-2-Makroglobulin
- Wirkungen von Proteasen und einigen bekannten Inhibitoren im Respirationstrakt
- Ansichten über die bakterio statische Wirkung des Serums
- Einfluß von Ca^{++} auf die proteolytische Aktivität der Kulturüberstände

F ZUSAMMENFASSUNG

G LITERATURVERZEICHNIS

E I N F Ü H R U N G

Die Geschichte der seuchenhaft auftretenden Krankheiten ist so alt wie die Menschheitsgeschichte.

Im Altertum war man der Ansicht, daß Krankheiten durch den Zorn der Götter hervorgerufen würden.

GALEN (129 - 201 n. Chr.) nennt zwei Ursachen für die Entstehung von Infektionskrankheiten und Epidemien:

- Das Miasma, ein als Ausdünstung aus dem Eraboden, den Sümpfen und verwesenden Kadavern gebildeter Stoff und
- Das Kontagium, das praktisch einer Ansteckung durch Berührung entsprach.

FRASCATORO veröffentlicht Mitte des 16. Jahrhunderts seine Anschauungen über die Verbreitung von Ansteckungstoffen, die er "seminaria morbi" - Samenkörner der Krankheit nennt.

Diese Stoffe werden folgendermaßen übertragen:

- per contactum also durch Berührung eines Infizierten
- per fomitem d.h. durch Zunder. Nach seiner Vorstellung haften die "seminaria morbi" wie glimmender Zunder an Gegenständen und Kleidung. Die Krankheit war bereits unterschwellig vorhanden.
- per distans ohne Berührung, durch die Luft.

Nach der Erfindung des Mikroskops konnten die Erreger der Krankheit sichtbar gemacht werden. Mit Einführung der Züchtungsverfahren war es möglich, die Infektionskrankheiten und ihre Erreger zu erforschen und sich vor ihnen zu schützen.

Um eine krankhafte Veränderung beurteilen zu können, wird eine genaue Kenntnis der normalen Verhältnisse vorausgesetzt. Dieser Satz ist auch für den Bereich der medizinischen Mikrobiologie anwendbar.

Dort lag das Hauptinteresse zunächst bei der Erforschung von Erregern der Infektionskrankheiten. Der Bedeutung der "normalen Bakterienflora" wurde bisher nur geringes Augenmerk gewidmet.

In der Regel sind Haut und Schleimhäute von einer Vielzahl von Mikroorganismen besiedelt, die grob in zwei Gruppen unterteilt werden können. Das sind:

- Keimarten, die an bestimmten Stellen des Körpers in einem gewissen Verhältnis ziemlich konstant anzutreffen sind, oder
- apathogene oder potentiell pathogene Keime aus der Umgebung des Individuums, welche die Haut und Schleimhäute für kurze Zeit besiedeln und für den Organismus bedeutungslos sind, solange die ständige Flora unversehrt bleibt.

Diese Keime werden als Resident- bzw. Transientflora bezeichnet.

Über die den Respirationstrakt besiedelnden Mikroorganismen ist, mit Ausnahme des Nasen-Rachen-Raumes noch wenig bekannt. Dies dürfte neben einer schwierigen Entnahmetechnik des Untersuchungsmaterials auch darin begrün-

det sein, daß die ersten Untersuchungen von Bronchialsekret fast völlige Keimfreiheit ergaben. Weiterhin wurde beobachtet, daß experimentell aspirierte Keime durch den Flimmerstrom der Epithelien, durch Sekretion von Hemmstoffen aus den Schleimhäuten und durch die Wirkung von Makrophagen und Leukozyten aus der Blutbahn an der Ansiedlung gehindert werden und meist nach einigen Stunden zugrunde gehen.

Die Auffassung von einem weitgehend keimfreien Tracheo-Bronchialtrakt wird allerdings von einigen Autoren angezweifelt.

Sputumuntersuchungen, die von KORTEKANGAS (20) durchgeführt wurden, ergaben eine größere Zahl von Mikroorganismen. In dem mit dem Bronchoskop gewonnenen Material ließen sich folgende Keime isolieren:

- vergrünende Streptokokken in 71 %
- andere Streptokokken und Pneumokokken in 9 %
- Neisserien in 30 %
- diphtheroide Stäbchen in 15 %
- Laktobakterien in 13 %
- Hefen

Auch SICHERT konnte bei Sektionen in fast der Hälfte der Fälle Hefen nachweisen. Allgemein läßt sich feststellen, daß eine verbesserte Untersuchungstechnik weitere Klärungen über eine bestehende Mikrobiozönose im Bereich des Tracheo-Bronchialtraktes erwarten läßt.

Der zunächst keimfreie Nasen-Rachen-Raum des Säuglings wird rasch mit Keimen aus der Umgebung besiedelt. Neben saprophytären Mikroorganismen finden sich, wie später

beim Erwachsenen, schon früh potentiell pathogene Keime.

Zahl und Zusammensetzung der Bakterien des Nasen-Rachen-Raumes unterliegen erheblichen Schwankungen. In der Regel überwiegen Kokken, wie vergrünende Streptokokken, *Staphylococcus albus* und *Neisseria catarrhalis*, doch man findet auch häufig diphtheroide Stäbchen und putride Keime. Die Besiedelung mit *Staphylococcus aureus* erfolgt so häufig, nämlich zu 30 - 50 % bei Gesunden, daß er von TOPLEY - WILSON zur normalen Flora der Nase gezählt wird.

Die Nasennebenhöhlen sind in der Regel frei von bakterieller Besiedelung.

Mehrere solcher Lebensgemeinschaften von Mikroorganismen, sogenannte Biozöosen, werden auf engstem Raum beobachtet. Die wichtigsten Milieufaktoren, die Keime zum Wachstum benötigen, sind Nährstoffe, Wärme, Feuchtigkeit und geeignete pH - Werte.

Diese Lebensbedingungen werden vom Makroorganismus nicht konstant gehalten, sondern unterliegen physiologischen Schwankungen, die durch Mahlzeiten, Schlaf bzw. Anstrengung, Alter, Gewohnheiten, Hormonhaushalt oder Stoffwechselprodukte bestimmt werden.

Um zu überleben müssen sich die Mikroorganismen der sich ständig ändernden Umwelt anpassen.

Um seinerseits zu überleben, zwingt sie der Makroorganismus durch abiotische Faktoren zu neuen adaptiven Leistungen.

Es stellt sich zwischen Wirtsorganismus und parasitär lebenden Organismen ein Gleichgewicht ein, das beiden einen geeigneten Lebensraum ermöglicht, so daß sie

leben können, ohne einander zu schaden, dies wird als Kommensalismus bezeichnet.

Keime der normalen Flora können unter Umständen aber doch Krankheiten hervorrufen, wenn zum Beispiel beim Makroorganismus durch Verletzung, Nährstoffmangel, Tumorge-schehen oder Unterkühlung eine geschwächte Abwehrkraft vorliegt.

Ansonsten harmlose Bakterien führen zu schweren Krankheitsbildern, sobald sie in andere Körperregionen verschleppt werden, so wie dies beispielsweise bei einer Peritonitis nach einer Darmverletzung oder einer Meningitis nach Eiterungen im Kopfbereich der Fall sein kann.

Stört man die Zusammensetzung einer Biozönose durch ein antibiotisch wirkendes Medikament, werden die empfindlichen Keime ausgeschaltet, die resistenten jedoch beginnen sich zu vermehren und schaden dadurch dem Organismus.

Als Beispiel sei hier der Soor nach Antibiotikatherapien erwähnt.

Parasitär lebende Bakterien benötigen ein Lebewesen, in dem sie passende Bedingungen für Wachstum und Fortpflanzung finden.

Die Wechselbeziehung zwischen Wirtsorganismus und Parasit läßt sich folgendermaßen charakterisieren:

- Die Partner fördern sich gegenseitig, sie leben in Symbiose
- Die Partner leben in enger, regelmäßiger Verbindung, ohne sich gegenseitig zu nützen oder zu schaden. Dies trifft auf die normale Flora des Menschen zu.

- Ein Partner zieht bedeutende Vorteile aus der Verbindung mit dem anderen. Dies nennt man Parasitismus.

Das Eindringen, die Ansiedlung und Vermehrung von parasitär lebenden Mikroorganismen wird einerseits durch bestimmte Eigenschaften des Parasiten begünstigt, andererseits durch verschiedene Abwehrmechanismen des Wirts gehemmt.

Die Eigenschaften von Keimen als Krankheitserreger werden durch die Begriffe "pathogen" und "virulent" beschrieben. Der Ausdruck "Pathogenität" bezeichnet die Fähigkeit von Mikroorganismen, Krankheiten zu verursachen oder zu einer progredienten Erkrankung zu führen.

Mit dem Ausdruck "Virulenz" bezeichnet man den Grad der Pathogenität, d.h. virulente Keime sind schon in geringer Zahl für den Wirtsorganismus pathogen.

Die Auswirkung von Bakterien, die auf verschiedenen Wegen in den Körper gelangen können, äußern sich in einer Vielzahl von Krankheitsbildern.

Sie können, je nach Virulenz der Keime bzw. der Resistenz des Wirtsorganismus leichtere oder schwerere Formen der Erkrankung zeigen.

Die wesentlichste Schädigung des Wirts durch Bakterien erfolgt durch deren Toxinabgabe.

Endotoxine sind im Bakterienleib enthaltene Stoffe, die bei Autolyse des Keims in die Umgebung freigesetzt werden. Es handelt sich dabei um Lipopolysaccharide, die etliche pathophysiologische Reaktionen hervorrufen können, wie zum Beispiel Fieber und Schock.

Exotoxine sind Stoffwechsel- oder Ausscheidungsprodukte von Bakterien mit meist spezifisch schädigenden Eigenschaften.

Um die Ausbreitung von Mikroorganismen im Gewebe zu fördern, werden wahrscheinlich Kollagenasen, Hyaluronidase, Streptokinase und extrazelluläre Proteasen gebildet, den Schutzmaßnahmen des Wirtsorganismus wird mit der Produktion von Koagulase, Hämolysinen und Leukozidinen begegnet.

Der Körper beantwortet die Toxinschädigung mit der Bildung von spezifischen Antikörpern, welche die Toxine zu binden, zu neutralisieren und aufzulösen vermögen. Gelingt es den Bakterien die physiologische Schranke, die von Haut, Schleimhaut und deren Sekreten gebildet wird, zu überwinden, so werden die Eindringlinge durch die zelluläre Abwehr des resistenten Körpers eliminiert. Eine solche Abwehr nennt man Phagozytose.

Der Begriff "Phagozytose" besagt die unter bestimmten Grenzflächenvoraussetzungen stattfindende Aufnahme von korpuskulären Fremdstoffen durch bewegliche oder ortsständige Zellen.

METSCHNIKOFF unterscheidet Mikrophagen und Makrophagen. Bei beiden handelt es sich um mesenchymale Zellen, wobei man unter Makrophagen Histiozyten, Fibroblasten und große Monozyten versteht.

Mikrophagen sind Granulozyten, die sich normalerweise im Blut befinden und durch einen Entzündungsreiz ins Gewebe einwandern können.

Bakterien werden von Phagozyten amöboid umflossen und

durch hydrolytische Enzyme gespalten und vernichtet.

Die stündliche Abwehrleistung von Phagozyten des gesunden Körpers wird auf eine Milliarde Keime geschätzt. Die Phagozytose sorgt aber nicht nur für die Beseitigung korpuskulärer Fremdstoffe, sondern sie ist auch für die Stimulierung spezifischer Antikörper notwendig, da sie das erforderliche, lösliche antigene Material liefert.

HAUPTTEIL

THEMATIK

In dem vorangestellten Teil sind sowohl die Voraussetzungen für ein friedliches Zusammenleben von Makro- und Mikroorganismus, wie die Möglichkeiten beider Partner sich anzupassen, um zu überleben kurz aufgezeigt worden.

Im folgenden Teil soll nun untersucht werden, wie die extrazelluläre proteolytische Aktivität der Bakterien durch natürliche Inhibitoren beeinträchtigt wird.

Daraus ergeben sich folgende Fragen, die Gegenstand der vorliegenden Untersuchung sind:

1. Wie läßt sich die Aktivität von bakteriellen Proteasen darstellen ?
2. Welche Inhibitoren kommen für eine Hemmung in Frage ?
3. Wie wirken diese Inhibitoren auf die proteolytische Aktivität der extrazellulären, bakteriellen Enzyme ?

STELLUNG DER MIKROORGANISMEN

Die entwicklungsmäßig ältesten Organismen hatten noch nicht alle Kennzeichen, die für das Pflanzen - oder Tierreich typisch sind.

HAECKEL bezeichnet diese, in der Mehrzahl Mikroorganismen, wie Bakterien, Blaualgen, Algen, Protozoen und Pilze als Protisten, Einzeller.

Sie sind Angehörige eines eigenen, praktisch noch nicht differenzierten Reiches.

Dieses Reich kann weiterhin in Prokaryonten und Eukaryonten unterteilt werden.

- Die Prokaryonten oder niederen Protisten, wie Bakterien und Blaualgen (Zyanophyzeen) besitzen ein Kernäquivalent, DNS, das nicht von einer Kernmembran umgeben ist.
- Die Eukaryonten oder höheren Protisten, wie Algen, Pilze und Protozoen zeichnen sich durch einen von einer Membran umgebenen Kern aus, der eine größere Anzahl sich mitotisch teilender Chromosomen enthält.

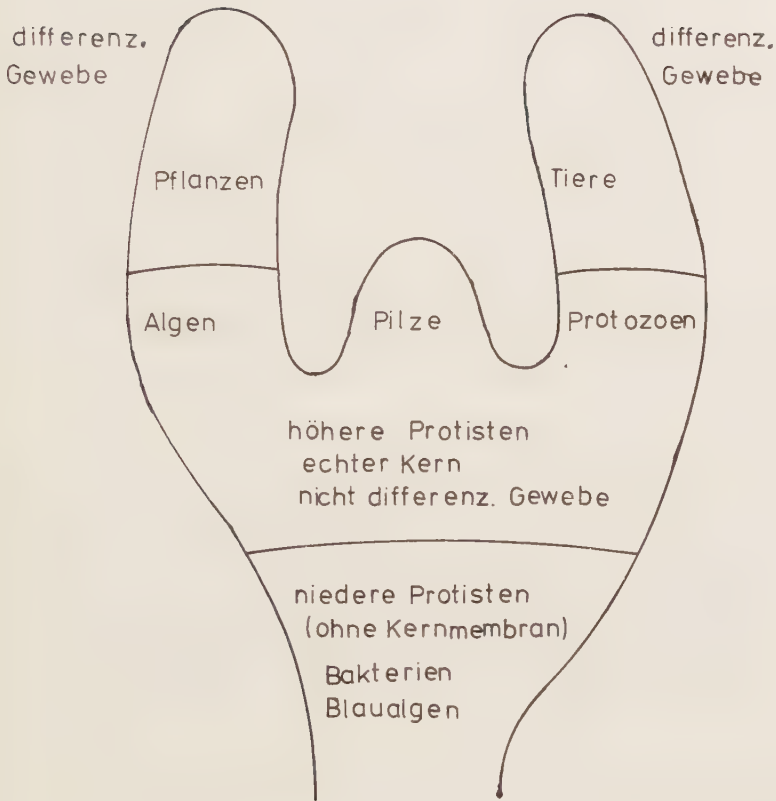


Abb. 1 : Stellung der Mikroorganismen im System der lebenden Organismen (modifiziert nach STARKA)

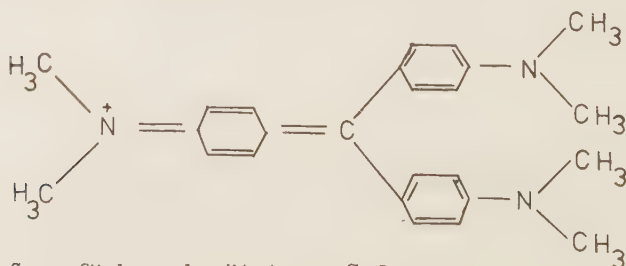
DIE GRAMFÄRBUNG

Nachdem über die Stellung der Mikroorganismen in der systematischen Einteilung der Lebewesen berichtet worden ist, soll nun auf die Vertreter der niederen Protisten, nämlich die Bakterien, näher eingegangen werden.

Neben einigen morphologischen Unterschieden, wie Form, Größe, Kapsel, Begeißelung, ist ein wichtiges Unterscheidungsmerkmal der Bakterien die Anfärbbarkeit nach GRAM.

Diese Differentialfärbung beruht darauf, daß manche Bakterien nach Behandlung mit einem Farbstoff und Beizung mit LUGOL'scher Lösung (Jodjodkalilösung) den Farbstoffkomplex bei Alkoholbehandlung nicht mehr abgeben, also die Farbe der Primärfärbung behalten und den Farbstoff der Gegenfärbung nicht annehmen. Bei anderen Bakterien wird der Farbstoffkomplex durch Alkohol ausgewaschen, und sie erscheinen unter dem Mikroskop in der Farbe der Kontrastfärbung.

Zur GRAM - Färbung sind basische Farbstoffe geeignet. Als bester Farbstoff hat sich Kristallviolett erwiesen, chemisch ein Hexamethylpararosanilin.



Zur Gegenfärbung benützt man Safranin.

Nach diesem Verfahren lassen sich die Bakterien in zwei große Gruppen einteilen, in die blaugefärbten grampositiven und die rotgefärbten gramnegativen Keime.

Zwischen der GRAM - Reaktion und biologischen Eigenschaften werden folgende Beziehungen gefunden:

- Grampositive Mikroben sind gegen Pankreassaft, Pepsin und Trypsin resistenter als gramnegative.
- Gramnegative Keime sind gegen die abtötende Wirkung der Säuren widerstandsfähiger als grampositive, die ihrerseits alkalienunempfindlicher sind.
- Grampositive Zellen sind empfindlicher gegen Penicillin und Sulfonamide als gramnegative.

Für unsere Untersuchungen dienten uns die Keime *Staphylococcus aureus* und *albus*, *Citrobacter intermedium* und *Proteus mirabilis*.

Nach der Einteilung von BERGEY (*Manual of Determinative Bacteriology...*) gehören die Bakterien *Staphylococcus aureus* und *albus* in die Ordnung IV der Eubacteriales, in die Familie VII der Micrococcaceae und zur Gattung des *Staphylococcus*.

STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Der *Staphylococcus aureus* besitzt eine kugelige Form von 0.8 - 1.0 μ Durchmesser, ist grampositiv, färbt sich aber auch mit anderen Farbstoffen gut an. Das Bakterium wächst aerob und anaerob in den üblichen Kulturmedien.

Ferner zerlegt es eine Reihe von Kohlehydraten unter kräftiger Säurebildung. Diagnostisch wichtig ist die anaerobe Vergärung von Mannit. Auch wird Nitrat durch eine Nitratase zu Nitrit reduziert, Ammoniak durch die Arginin - Dehydrolase aus Pepton gebildet. Proteasen, Lipasen, Phospholipasen, Nukleasen und Elastasen werden produziert.

Die meisten Stämme vermögen noch tierisches Protein zu hydrolysieren, wie zum Beispiel Hämoglobin, Fibrin, Eiklar, Kasein und Gelatine.

Bei Luftzutritt bildet der *Staphylococcus aureus* orangegelbes Pigment, welches den wasserunlöslichen Karotinoiden zugeordnet wird.

Ein wichtiger Hinweis auf die Pathogenität des Keims ist die Staphylokoagulase und Hyaluronidase.

Die von Staphylokokken gebildete Koagulase führt zusammen mit einem im menschlichen Blut gebildeten "Aktivator" zur Gerinnung von Plasma. So wird eine Fibrinhülle gebildet, welche vor der bakteriziden Wirkung der körpereigenen Abwehr schützt und den Zugang von Antibiotika erschwert.

Die Hyaluronsäure bildet vor allem die "Kittsubstanz" des Mesenchyms.

Die Hyaluronidase, die unter anderem von *Staphylococcus aureus* gebildet wird, depolymerisiert die Hyaluronsäure und erleichtert den Bakterien das Eindringen ins Gewebe.

Pathogene Staphylokokken findet man normalerweise in geringer Anzahl auf der Haut, häufiger auf den Schleimhäuten, vor allem aber auf denen der Mundhöhle und des Nasen-Rachen-Raumes. Dort können sie Nasen- und Lippenfurunkel, Angina und Pharyngitis hervorrufen, an anderen Stellen verursachen sie Furunkel, Karbunkel, Paronychien,

Panaritien, Mastitis puerperalis, Pemphigus neonatorum und Impetigo contagiosa.

Sekundär besiedelt der *Staphylococcus aureus* mit anderen pathogenen Keimen häufig Brandwunden, chirurgische Wunden und Dekubitalgeschwüre.

Er besitzt die Neigung, sich septisch auszubreiten, was meist mit einer Thrombophlebitis der Venen in der Nähe des Primärherdes beginnt. Die Staphylokokkensepsis kann in zwei Verlaufsformen auftreten:

- entweder foudroyant und meist tödlich verlaufend, oder
- mehr als chronisches Krankheitsbild mit multiplen Abszeßbildungen in Herz, Niere, Lunge und Knochen.

STAPHYLOCOCCUS ALBUS

In der Systematik der Mikroorganismen gehört auch der *Staphylococcus epidermidis* oder *Staphylococcus albus* der gleichen Ordnung, Familie, Stamm und Gattung an, wie der *Staphylococcus aureus*, er wird nur einer anderen Art zugeteilt.

Er ist kleiner als der *Staphylococcus aureus*, bildet kein Pigment und vergärt auch Mannit nicht. Gelatine wird zwar hydrolysiert, aber es fehlen die Pathogenitätsmerkmale, wie Plasmakoagulase und Hyaluronidase. Der *Staphylococcus epidermidis* ist ein Saprophyt der Haut und Schleimhäute und ist daher häufig in der Mundhöhle anzutreffen. Gelegentlich findet man ihn in Hautwunden, wo er dann Ursache für harmlose Eiterungen ist.

CITROBACTER INTERMEDIUS

Das Bakterium *Citrobacter intermedius* oder *Escherichia Freundii* hat folgende Stellung in der systematischen Einteilung der Bakterien.

Nach älterer Ansicht gehört es zur Ordnung IV der Eubacteriales, zur Familie IV der Enterobacteriaceae, zum Stamm I der Escherichieae, zur Gattung I der *Escherichia*, zur Art der *Escherichia Freundii* oder *Citrobacter intermedius*.

Dies ist ein kapsellooses, gramnegatives, peritrich begeißeltes Stäbchen, von 2 - 4 μ Länge, welches auf gewöhnlichen Nährböden wächst und Citrat als einzige Kohlenstoffquelle verwerten kann. Das Wachstum des Keimes wird durch KCN ebensowenig gehemmt, wie durch andere Substanzen, auf welche Colibakterien empfindlich reagieren.

Den *Citrobacter intermedius* findet man in Speisen, Wasser und Fäzes.

Normalerweise wird er als Bewohner des Verdauungstraktes angesehen, man isoliert ihn aber auch bei Infektionen der Gallenblase, des Urogenitaltraktes, des Mittelohres und der Meningen.

Citrobacter - Keime veranlassen als Vertreter der Enterobacteriaceae die Bildung von Antikörpern. Serologische Reaktionen zur Differenzierung der sogenannten Bethesda - Ballerup - Gruppe wurden von WEST und EDWARDS erforscht, und man fand 32 O - und 87 H - Antigene.

Abschließend soll noch einmal auf die Taxonomie eingegangen werden. In letzter Zeit wurde die Gattung III

der Citrobacter für Citrat verwertende, Laktose spaltende coliformen Bakterien geschaffen.

Früher wurden ihre Arten oft der Gattung der Escherichia zugeordnet. Citrat verwertende und Laktose langsam spaltende "Paracoli" wurden einmal als Bethesda-Ballerup-Gruppe bezeichnet. Serologische Untersuchungen ergaben identische Antigene mit Citrobacterkeimen.

Ebenso werden einige Serotypen von Escherichia coli neuerdings zur Gattung der Citrobacter gezählt, ohne zwischen einer schnellen oder langsamen Laktosespaltung zu unterscheiden.

PROTEUS MIRABILIS

Taxonomisch zählt man Proteusbakterien zur Ordnung der Eubacteriales, zur Familie der Enterobacteriaceae, zum Stamm der Proteaceae, zur Gattung der Proteus.

Der von uns verwendete Keim "Proteus mirabilis" ist eine Art dieser Gattung.

Proteusbakterien gehören zu den stärksten Proteolyten, die im menschlichen Körper gefunden werden. Sie sind gramnegative, etwa 3 μ lange Stäbchen. Durch peritrich angeordnete Geißeln sind die Keime außerordentlich beweglich und schwärmen auf Agarplatten aus.

Die Proteusbakterien sind sehr anspruchslos und vermehren sich auf allen üblichen Nährböden. Als Stickstoffquelle sind Ammonium - Ionen, und als Energie- und Kohlenstoffquelle ist Glukose ausreichend. Aus Glukose, nicht aber aus Laktose werden Säure und Gas gebildet. Nitrat wird zu Nitrit reduziert und Harnstoff wird gespalten.

Proteus mirabilis produziert auch aus Saccharose Gas,

produziert Schwefelwasserstoff, verflüssigt Gelatine und wächst auf Zyanidnährböden.

Proteus - Stämme sind in der Natur weitverbreitet und werden beim Menschen als harmlose Darmbewohner angesehen. Beim Eindringen ins Gewebe können sie jedoch Peritonitis, Cholecystitis, Otitis, Meningitis, Cystitis und andere eitrige Prozesse verursachen. Ferner besiedeln sie als Sekundärkeime chirurgische Wunden und Brandwunden und verzögern den Heilungsprozeß.

Bei Proteusbakterien wurden zunächst Oberflächen- und Geißelantigene (O - und H-Antigene) gefunden. Serologische Bestimmung hat sich aber bei Routineuntersuchungen nicht durchsetzen können, sie ist lediglich von wissenschaftlichem Interesse.

PROTEASEN

Man nimmt an, daß die Produktion von extrazellulären bakteriellen Proteasen zwei Funktionen zu erfüllen hat, nämlich Ernährung und Ausbreitung der Keime.

Durch diese Enzyme werden große Proteinmoleküle in Bruchstücke, wie Peptide und Aminosäuren gespalten, die dann die Bakterienmembran passieren und so dem Stoffwechsel zugeführt werden können.

Die Proteinanteile des Deck- und Bindegewebes sowie der interzellulären Bestandteile werden auf die gleiche Weise zerstört, was eine verbesserte Invasion der Keime ins Gewebe zur Folge hat.

Über die Eigenschaften und Strukturen der Proteasen der eben beschriebenen Keime ist nur wenig veröffentlicht. Es wird meist qualitativ von starken Proteolyten oder

proteolytischer Aktivität gesprochen. Wahrscheinlich handelt es sich bei diesen extrazellulären Proteasen um ein Enzymgemisch, in dem sich Komponenten mit verschiedenen Eigenschaften befinden. Es ist denkbar, daß die von MUSZINSKI an *Pseudomonas aeruginosa* gewonnene Erkenntnis auf andere proteolytische Keime übertragbar ist, nämlich daß zwischen Proteasenproduktion und Virulenz des Keimes ein direkter Zusammenhang besteht.

Besser erforscht sind jedoch die Eigenschaften der Inhibitoren, die nun kurz beschrieben werden sollen.

INHIBITOREN

Bei der Auswahl der Proteaseninhibitoren für unsere Versuche gingen wir von folgenden Überlegungen aus:

1. Von pflanzlichen Inhibitoren wird angenommen, daß sie zur Inaktivierung proteolytisch wirksamer Noxen produziert werden.(33) Man sieht sie auch im Zusammenhang mit einer Schutzfunktion gegenüber Proteasen von symbiontisch lebenden Bakterien und Pilzen.
2. Mehrere Serumglobuline besitzen die Eigenschaft, proteolytisch wirksame Enzyme hemmen zu können, z.B. Trypsin, Chymotrypsin, Elastase, Plasmin und Thrombin.
Wahrscheinlich spielen diese Inhibitoren eine Rolle bei der Aufrechterhaltung des Gleichgewichts im Blutgerinnungssystem und beim Schutz der Proteinstrukturen gegenüber der zerstörenden Wirkung von Pankreasenzymen.
3. Natürliche Protease-Inhibitoren werden schon

therapeutisch eingesetzt, um einer unkontrollierten Freisetzung von Kininen durch Proteasen entgegenzuwirken. (33)

Kinine, das sind membran-aktive Polypeptide, sollen bei der Entstehung pathologischer Vorgänge, wie Entzündung, akute Pankreatitis und Schock beteiligt sein.

Ferner wird berichtet, daß Proteasen aus *Pseudomonas aeruginosa* und *Proteus vulgaris* durch α 2 - MG gehemmt werden. (21) (16)

Nun trachtet man danach, zu erfahren, welche Wirkung die natürlichen Proteaseninhibitoren auf die proteolytischen Enzyme der oben beschriebenen Bakterienstämme entfalten.

Zu den natürlichen Inhibitoren werden zum einen die pflanzlichen Inhibitoren gerechnet, zum anderen die Inhibitoren des tierischen und menschlichen Organismus. Sie werden grob nach ihrem Hemmspektrum eingeteilt, so können polyvalente und monovalente Inhibitoren unterschieden werden. (33)

Die in den Versuchen eingesetzten Inhibitoren werden noch genauer beschrieben.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

MATERIALIEN

A Die Proteasen

1. Die Herkunft der Proteasen

Definierte Stämme von *Proteus vulgaris* 103, *Proteus* *Rettgeri*, *Proteus Morganii*, *Proteus mirabilis* (ATCC), sowie nicht näher bestimmte Stämme von *Escherichia coli*, *Staphylococcus albus*, *Staphylococcus aureus* *haemolyticus* und *Citrobacter intermedius* wurden vom Routinelabor des Max-von-Pettenkofer-Institutes für Hygiene und medizinische Mikrobiologie der Universität München zur Verfügung gestellt.

2. Gewinnung

Zur Züchtung wurden diese Keime 18 Stunden bei 37° C in Peptonbouillon - Schüttelkulturen inkubiert. Danach betrug die optische Dichte dieser Kulturen 2,5 - 3. Zur Entfernung der zellulären Bestandteile der Bakterien aus den Kulturflüssigkeiten folgte eine 20 minütige Zentrifugation bei 10.000 UpM. Diese lange Zentrifugationszeit und die hohe Umdrehungszahl waren nötig, um zelluläre Bakterienbestandteile, die fast die gleiche Dichte, wie das Nährmedium haben, auszusondern. Die während des Zentrifugierens entstandene Reibungswärme wurde abgeleitet, um eine Enzymschädigung auszuschließen. Anschließend wurde eine Dialyse der klaren Flüssigkeit vorgenommen.

Dieser 72 Stunden dauernde Vorgang diente zur Entfernung der Pepton-Moleküle der Nährlösung aus den Kulturüberständen.

Die verbliebenen hochmolekularen extrazellulären Substanzen wurden durch Gefriertrocknung konserviert.

Jeweils 60 mg des Lyophilisats wurden in 30 ml Boratpuffer 0.05 M, pH 7.8, enthaltend 0.1 M NaCl, gelöst und an einer 120 cm langen Sephadex G 75 - Säule im gleichen Puffer fraktioniert. Die später verwendeten Enzyme des Eluats wurden ermittelt, indem man in aliquoten Teilen die proteolytische Aktivität bestimmte.

Auf diese Weise wurden alle oben genannten Kulturüberstände behandelt. Keine nennenswerte proteolytische Aktivität wurde bei den Kulturüberständen von *Proteus vulgaris* 103, *Proteus Rettgeri*, *Proteus Morganii*, sowie *Escherichia coli* gefunden.

Proteasehaltige Fraktionen der Kulturüberstände von *Proteus mirabilis* (ATCC), *Citrobacter intermedius*, *Staphylococcus albus* und *Staphylococcus aureus haemolyticus* wurden vereinigt und durch Druckdialyse auf 10 ml eingeengt.

Diese Dialysate wurden als Proteasenquellen verwendet.

B Die Inhibitoren

Das menschliche Blut enthält Plasmaproteine, von denen 10 % die Fähigkeit besitzen, die proteolytische Aktivität von Trypsin zu hemmen. Deshalb kam Humanserum als Inhibitormaterial bei unseren Versuchen zum Einsatz. (13)

Es wurden die im Serum enthaltenen Inhibitoren α_1 - Antitrypsin (AT) und α_2 - Makroglobulin (MG) getestet, ferner der polyvalente Proteaseninhibitor aus Rinderorganen, Inhibitoren aus Eiklar, des weiteren der Inhibitor aus der Glandula submandibularis des Hundes und zuletzt als Vertreter der pflanzlichen Inhibitoren, diejenigen aus Roggenkeimen und Sojabohnen.

I. Serum

Um den gleichen Inhibitorgehalt zu gewährleisten, wurde für die Versuche Serum als Konserve von der Blutbank bezogen. Es wurde in der Verdünnung 1:10 und 1:50 getestet.

II. α_1 - Antitrypsin (α_1 - AT)

Dieser polyvalente Inhibitor stammt aus der α_1 - Globulinfraction. Neben Trypsin, Chymotrypsin, Plasmin, Pankreas-Kallikrein und Elastase hemmt α_1 - Antitrypsin Leukozytenproteasen.

α_1 - AT besitzt 90 % der Proteasenhemmkapazität des Serums. 1 μ g reines Präparat α_1 - AT hemmt 0.4 - 0.6 μ g, 1 ml Serum etwa 0.4 - 2.0 mg Trypsin.

Das pH - Optimum für α_1 - Antitrypsin liegt im neutralen Bereich.

Das von uns verwendete Präparat wurde von den Behring-Werken bezogen.

III. α_2 - Makroglobulin (α_2 -MG)

Auf diesen polyvalenten Inhibitor entfallen nahezu 10 % der trypsininhibitorischen Kapazität des Serums. Er wird in der α_2 - Globulinfraktion des Humanserums gefunden. Plasmin, des weiteren Trypsin, Chymotrypsin, Plasma - Kallikrein, Thrombin und Elastase vermag er sehr gut zu hemmen.

α_2 - Makroglobulin ist relativ temperaturunempfindlich, d.h., sowohl bei 0° C als auch bei hohen Temperaturen ist das α_2 - MG gleichermaßen in der Lage, Proteasen zu binden.

Ferner ist es in TCA löslich, was die Abgrenzung zum α_1 - Inhibitor möglich macht.

Der Inhibitor hat ein sehr hohes Molekulargewicht von 820.000. 1 mg α_2 - MG kann 17 - 40 μ g Trypsin hemmen. (33)

Das von uns verwendete Präparat wurde von den Behring-Werken besorgt.

IV. Inhibitor aus der Glandula submandibularis des Hundes

Der aus der submandibulären Speicheldrüse des Hundes gewonnene Inhibitor ist hitze- und säurestabil und nicht fällbar. Sein Molekulargewicht liegt bei 13.000.

Der Inhibitor hemmt Trypsin, α_1 -Chymotrypsin, Subtilisin NOVO, Pankreaselastase, Plasmin und Proteasen von *Aspergillus oryzae*.

Neuere Untersuchungen haben gezeigt, daß das Inhibitor-

molekül doppelköpfig ist, d. h., es sind ein trypsin-reaktives Zentrum und ein Hemmzentrum für Chymotrypsin vorhanden.

Der von uns verwendete Inhibitor wurde in l.c. (8) hergestellt.

V. Polyvalenter Rinderorgan - Inhibitor

Der von uns verwendete Inhibitor war das Präparat "TRASYLOL®" der Fa. Bayer. Er wird hauptsächlich aus Glandula parotis und Lunge von Rindern gewonnen. Sein Molekulargewicht beträgt 6.700 ± 200 . Der Inhibitor ist hitze-und säurestabil. Er vermag Trypsin, Chymotrypsin, Kallikrein, Plasmin und einige Bakterienproteasen zu hemmen, weiterhin Elastase und Thrombin. (33)

VI. Inhibitor aus Keimen von Roggen

Dieser Inhibitor wurde aus Keimlingen der Roggen- und Weizensamen gewonnen. Er konnte in einen einheitlichen Inhibitor mit dem Molekulargewicht 1700 und drei weitere Inhibitoren mit dem Molekulargewicht 1200 aufgespalten werden. Diese Inhibitoren sind spezifische Trypsininhibitoren mit permanenter Wirkung.

Der von uns verwendete Inhibitor wurde wie in l.c. (15) hergestellt.

VII. Inhibitor aus Sojabohnen

Die bei der Verfütterung von Sojabohnenmehl beobachtete Wachstumshemmung und Pankreashypertrophie war Anlaß für die Suche nach dem verantwortlichen Faktor, den man schließlich in dem gefundenen Proteaseninhibitor ver-

mutete. (12)

Dieser Inhibitor hat ein Molekulargewicht von 20.000; er ist empfindlich gegenüber extremen pH - Werten, außerdem ist er thermolabil.

Der Sojabohneninhibitor (SBI) ist hauptsächlich ein Hemmstoff für Trypsin, er vermag jedoch auch Chymotrypsin, Serum, Kallikrein und Plasmin (32) (19) zu hemmen.

Bemerkenswert ist die Tatsache, daß die nach BOWMAN - BIRK isolierte Inhibitorfraktion gegenüber Chymotrypsin A 13 mal so aktiv ist, wie der SBI nach KUNITZ, ferner ist sie stabil gegen Säuren, Alkalien, Temperatur und Pepsin. (3)

Bei unseren Versuchen kam ein Sojabohnen - Trypsin - Inhibitor der Fa. Merck zum Einsatz.

VIII. Inhibitoren aus Eiklar

RHODES und FEENEY trennten Eiklar in folgende Fraktionen auf: Ovomucoid, Ovalbumin A₁, A₂, A₃, Globuline, Conalbumin, Avidin und Lysozym. (29)

Die Proteasenhemmkapazität des Eiklars ist weitgehend der Ovomucoid - Fraktion zuzuordnen. (23)

Ovomucoid hat einen Kohlehydratanteil von 10 - 20 % in Form der Sialinsäure, es fehlen die Aminosäuren Tryptophan und Hydroxyprolin. (31) Es ist säurestabil, was auf den Kohlehydratanteil zurückzuführen ist, wird aber im alkalischen Bereich rasch denaturiert und durch Pepsin abgebaut. Das Molekulargewicht liegt bei ca. 28.000.

Ovomucoid hemmt Trypsin von Säugetieren und Vögeln (30), menschliches Trypsin dagegen wird nicht gehemmt. (5)

Chymotrypsin wird von Hühnereiklar nicht gehemmt, ebenso wie Plasmin und Pankreaticopeptidase E (= Elastase).

Einige Bakterienproteasen werden durch Ovomucoid gehemmt, z. B. Aspergillusprotease und Subtilopeptidase. (24)

Das von uns verwendete Inhibitormaterial bestand aus Hühnereiklar, das mit TRA - Puffer entsprechend verdünnt wurde.

METHODEN

Bei unseren Versuchen wurden im wesentlichen drei Testmethoden angewandt.

I. Bestimmung der Hemmkapazität

Um den Inhibitorgehalt einer Lösung mit Proteaseninhibitoren genau feststellen zu können, ist es erforderlich, eine vom Inhibitor hemmbare, definierte Proteasenmenge ein geeignetes Substrat verdauen zu lassen.

Die bei der Spaltung entstandenen Substratbruchstücke können photometrisch durch Extinktionsänderung nachgewiesen werden. Es besteht ein lineares Verhältnis zwischen Zeiteinheit der Messung und der Quantität der Spaltprodukte. Bei der Zugabe von Inhibitorlösung konnte eine Abnahme der Extinktionsänderung in der Zeiteinheit gemessen werden.

Diese Verminderung der Extinktionsdifferenz gegenüber dem Leerwert (Spaltansatz ohne Inhibitor) ist ein Maß für den Inhibitorgehalt der Lösung.

Nach bekannter Methode wird Trypsin als Protease gegen das synthetische Substrat N - α - Benzoylarginin - p - nitro - anilid (BAPA) zur Spaltung verwendet. (9)

Ohne Inhibitorzusatz mißt man eine Extinktionszunahme von 0.0033 Teilstrichen pro μ g Trypsin pro Minute.

Die Hemmkapazität wird in ImU (= Inhibitor milli Units) pro ml Inhibitorlösung gemessen, bzw. pro mg Protein. Ein ImU ist diejenige Inhibitormenge, die die hydrolytische Wirkung von 1 μ g Trypsin gegen BAPA aufhebt. Das bedeutet am Photometer eine Verminderung der Extinktionszunahme von 0.0033 Teilstrichen pro Minute.

Ansätze:

In Küvetten (d = 1 cm) eines mit Thermostat ausgestatteten Photometers waren bei 25° C 10 μ g Trypsin eingebracht, das in 0.2 ml 0.0025 n HCl gelöst ist. In der Küvette mit dem ungehemmten Spaltwert wird mit 0.2 M Triäthanolamin - HCl - Puffer (TRAP), pH 7.8, zum Endvolumen 2 ml aufgefüllt.

In die weiteren Küvetten werden 0.05 - 0.2 ml, je nach Hemmstoffgehalt, inhibitorhaltige Lösungen eingesetzt und jeweils mit demselben TRA-Puffer aufgefüllt. Nach ca. 5 - minütiger Vorinkubation wird je ein ml in Wasser gelöstes BAPA - Substrat zugegeben und der Inhalt jeder Küvette gut durchgemischt. Mit dem Filter 405 nm wird die Extinktionszunahme pro Minute gemessen und der Inhibitorgehalt mit der folgenden Formel ermittelt:

$$\frac{\frac{\Delta LW}{\text{min}} - \frac{\Delta E_H}{\text{min}}}{0,0033} \cdot x = \frac{\text{Anzahl der ImU}}{\text{mg Inhibitorprotein}}$$

Zeichenerklärung:

ΔE_H = Extinktionsänderung der Lösung mit Inhibitor

ΔLW = Extinktionsänderung des reinen Spaltwertes

X = Verdünnungsfaktoren der Inhibitorlösung

Diese Methode diente zur Bestimmung äquivalenter Inhibitormengen für die jeweiligen Ansätze gegen die Proteasen aus *Proteus mirabilis*, *Citrobacter intermedius*, *Staphylococcus albus* und *Staphylococcus aureus haemolyticus*.

II. Proteasenaktivitätstest mit Azokasein

Um die gesamte proteolytische Aktivität der Kulturüberstände der oben genannten Keime zu messen, verwenden wir das unspezifische Proteasensubstrat Azokasein. Es sei kurz das Prinzip des Azokaseintests erläutert:

Die hochmolekularen Bestandteile der Azokaseinlösung werden durch die Einwirkung von Proteasen in niedermolekulare Teilprodukte gespalten. Gibt man hochmolekulares Substrat im Überschuß und fällt nach einer bestimmten Zeit den hochmolekularen Rest aus, so kann der entstandene, in Lösung gebliebene, niedermolekulare Anteil photometrisch gemessen werden.

Die Extinktionszunahme gegenüber einem gleichen, aber sofort gefällten Ansatz ist ein Maßstab für die Aktivität der proteolytischen Enzyme. Bei der Zugabe von Inhibitor verringert sich die proteolytische Aktivität,

folglich entstehen weniger niedermolekulare Spaltprodukte, daraus resultiert eine verminderte Extinktion. Die Extinktionsabnahme ist ein Maß für die Hemmwirkung des zugegebenen Inhibitors. (10)

Ansätze :

Nach den Vorversuchen stellte sich heraus, daß folgende Mengen die besten Ergebnisse aufwiesen :

0.2 ml des Überstandes der Druckdialyse werden eingesetzt und mit 0.3 ml 0.2 M Triäthanol - HCl - Puffer (TRAP), pH 7.8, wird ein Volumen von 0.5 ml hergestellt. Dieser Ansatz wird mit einem ml einer 2 %igen Azokaseinlösung im gleichen Puffer für 18 Stunden bei einer Temperatur von 37° C inkubiert.

Anschließend wird durch Zugabe von 1.5 ml einer 5 %igen Trichloressigsäure (TCA) hochmolekulares, unverdautes Substrat ausgefällt und somit die Reaktion unterbrochen. Danach folgt für die Dauer von 5 Minuten eine Zentrifugation bei 4.000 UpM. Der Überstand wird filtriert und die Extinktionszunahme der so gewonnenen klaren Flüssigkeit am Photometer gegen einen sofort gefällten Spaltansatz gleicher Zusammensetzung bei 366 nm gemessen.

Die Druckdialysate erbrachten unter den oben beschriebenen Bedingungen die in der Tabelle angeführten Extinktionsänderungen bei $d = 1$ cm.

Extinktionszunahme der Ansätze von:

Citrobacter intermedius : 331 - 352

Proteus mirabilis : 690 - 725

Staphylococcus aureus

Fraktion I : 520 - 615

Fraktion II : 375 - 410

Staphylococcus albus : 595 - 620

Diese Extinktionen wurden jeweils als relative Enzymaktivität von 100 % bezeichnet. Sie diente als Ausgangswert für die weiteren Versuche, insbesondere auch für die Untersuchungen der Hemmfähigkeit der einzelnen Inhibitoren.

III. Proteasenaktivitätstest bei verschiedenen pH-Werten

Um optimale Milieuverhältnisse für unsere Versuche zu gewährleisten, war es notwendig, die Aktivität der proteolytischen Enzyme bei verschiedenen pH - Werten zu untersuchen. Wir wählten für den Aktivitätstest den Bereich von pH 4 bis pH 10 jeweils in Abständen von pH 1.0. Dies ermöglichte uns eine relativ genaue Aussage über das Wirkungsoptimum der zu untersuchenden Proteasen.

Für die pH - Werte 4, 5 und 6 wurde ein 0.2 M Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4) - Puffer verwendet, für die pH - Werte 7, 8, 9 und 10 ein 0.2 M Dinatriumhydrogen-

phosphat (Na_2HPO_4) - Puffer.

Die Einstellung der jeweiligen pH - Werte erfolgte mit konzentrierter HCl bzw. konzentrierter NaOH.

IV. Bestimmung der Hemmkapazität der Inhibitoren

Um die Wirkung der verschiedenen Inhibitoren gegen die Proteasen der Kulturüberstände zu bestimmen, wurden zu den oben beschriebenen Standardansätzen steigende Mengen Inhibitor zugesetzt. Diese Konzentrationen der verwendeten Inhibitorlösungen wurden mit dem Antitrypsin - BAPA - Test unter Standardbedingungen ermittelt. Somit kommen bei den Hemmversuchen aliquote Teile mit gleicher Inhibitionsaktivität (ImU) gegen Trypsin zum Einsatz.

Ansätze:

0.2 ml des Überstandes der Druckdialyse werden mit Inhibitorlösungen in 0.2 M TRAP, pH 7.8 und Puffer allein auf ein Endvolumen von 0.5 ml gebracht. Es folgt die Zugabe von 1 ml 2 %iger Azokaseinlösung im gleichen Puffer und Inkubation für 18 Stunden bei 37° C, Fällung mit 1.5 ml 5 %iger TCA, Zentrifugation, Filtration und photometrische Auswertung bei 366 nm.

Die besten Hemmkurven ergaben sich bei einer Verdünnung des Serums von 1:10.

Die Hemmkapazität gegen Trypsin entsprach bei den zu untersuchenden Inhibitoren der Trypsinhemmkapazität des Serums.

Die verwendeten Mengen Inhibitorlösung stiegen von 0.05 auf 0.2 ml an.

ER G E B N I S S E

Nach der oben angegebenen Methode wurden die Kulturüberstände von *Proteus vulgaris* 103, *Proteus Rettgeri*, *Proteus Morganii*, *Proteus mirabilis* (ATCC), *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus haemolyticus*, *Staphylococcus albus* und *Citrobacter intermedius* lyophilisiert, und bei verschiedenen pH - Werten die proteolytische Aktivität geprüft.

Eine deutliche proteolytische Aktivität zeigten lediglich die Kulturüberstände von *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus haemolyticus*, *Staphylococcus albus* und *Citrobacter intermedius*. Nachdem die extrazellulären Proteasen dieser Keime durch Säulenchromatographie gereinigt worden waren, wurden von *Staphylococcus aureus haemolyticus* zwei Fraktionen mit proteolytischer Aktivität gefunden.

Beim Aktivitätstest mit verschiedenen pH - Werten zeigte sich, daß alle Proteasen ein pH - Optimum im physiologischen Bereich bei pH 8 besaßen, lediglich die Fraktion I der *Staphylococcus aureus haemolyticus*-Proteasen hatte ihr Optimum bei pH 6 (Abb. 2).

Mit der Serumverdünnung wird die proteolytische Aktivität aller von uns untersuchten Bakterienproteasen zum größten Teil gehemmt (Abb. 3).

Die Proteasen aus *Citrobacter intermedius* waren zu 78 % und die Proteasen des *Staphylococcus albus* bis zu 85 % hemmbar.

Bei den Proteasen aus *Proteus mirabilis* und aus *Staphylococcus aureus haemolyticus* Fraktion II wurde mit Human-

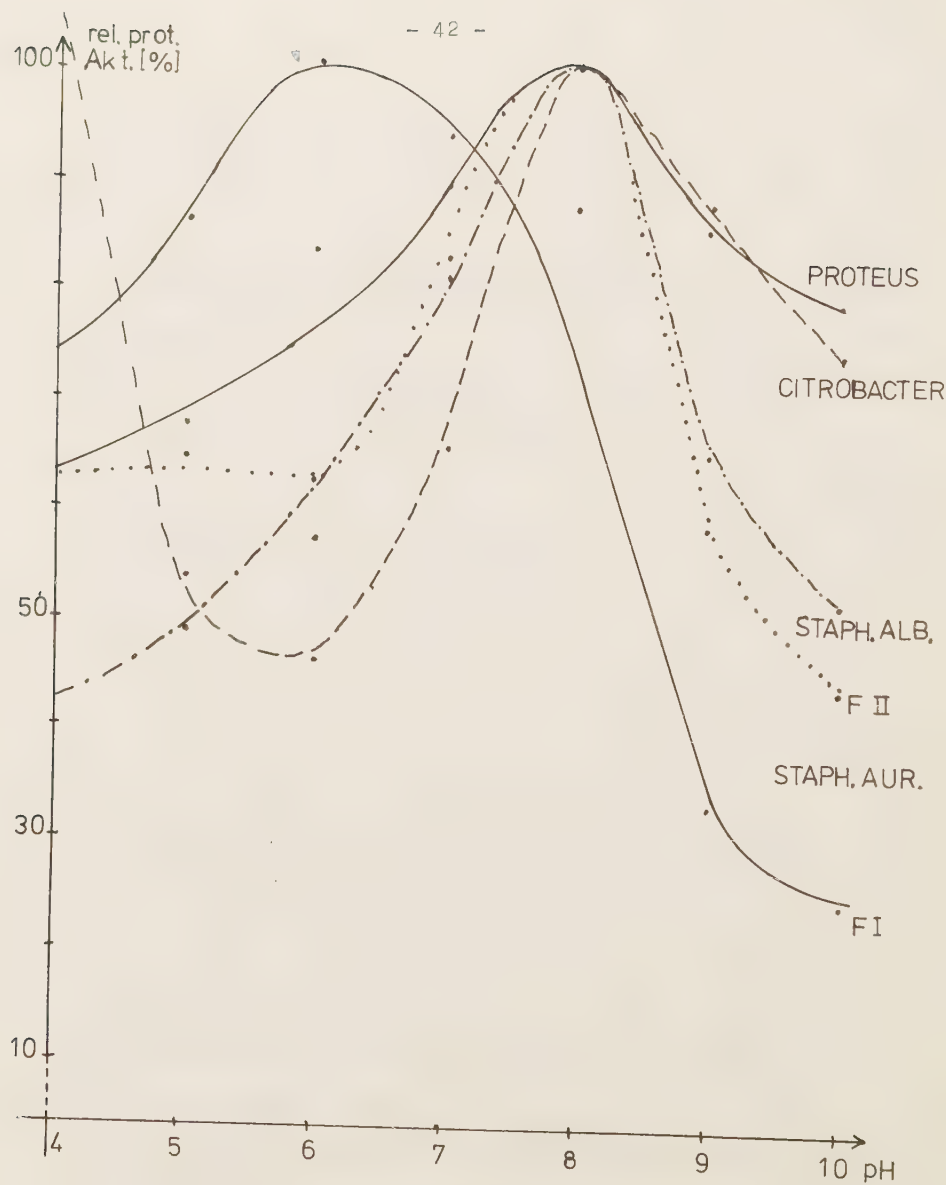


Abb. 2 : Darstellung der Aktivität der Bakterienproteasen bei verschiedenen pH - Werten

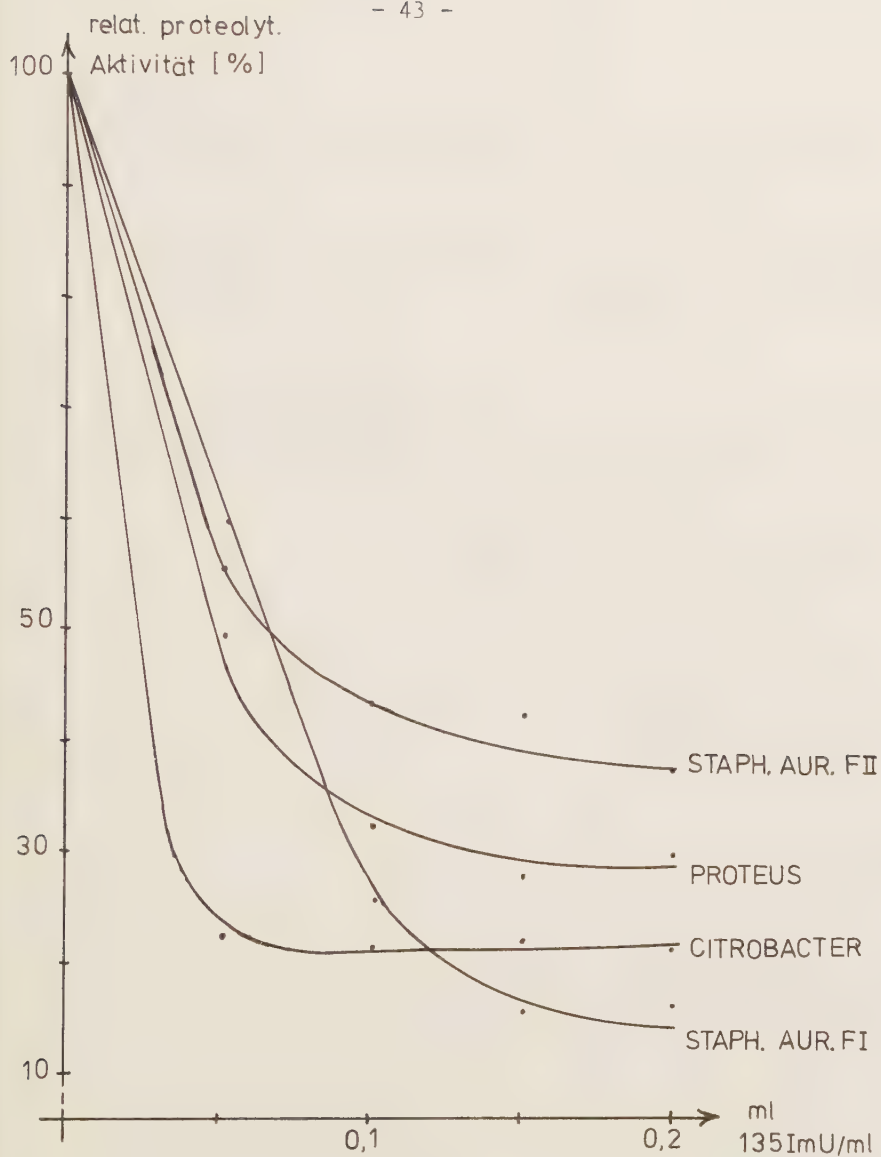


Abb. 3 : Darstellung der Hemmwirkung von Serum-
verdünnung (1:10) auf Bakterienproteasen

serum als Inhibitor unter gleichen Bedingungen eine geringere Hemmkapazität erzielt, nämlich 70 % bzw. 58 % .

Beim Einsatz von 0.1 mg α_2 - Makroglobulin - Trocken - substanz werden für die folgenden Proteasen die aufgeführten Hemmwerte erzielt:

Proteasen aus :	Hemmwirkung in % :
Proteus mirabilis	37 %
Staphylococcus aureus haemolyticus	
Fraktion I	52 %
Fraktion II	53 %
Citrobacter intermedium	70 %
Staphylococcus albus	75 %

Die Hemmkurven zu diesen Endwerten sind in Abb. 4 dargestellt.

Mit Ovomuroid aus Eiklar mit hoher inhibitorischer Wirkung gegen Trypsin (22.000 ImU / ml) konnte im Standardhemmansatz bei 1350 ImU / ml keine Hemmwirkung gegen unsere Bakterienproteasen nachgewiesen werden.

Im Überschuß gegeben, nämlich 11.000 ImU / ml, ließ sich eine Teilhemmung erzielen, die aber keine Rückschlüsse zuläßt.

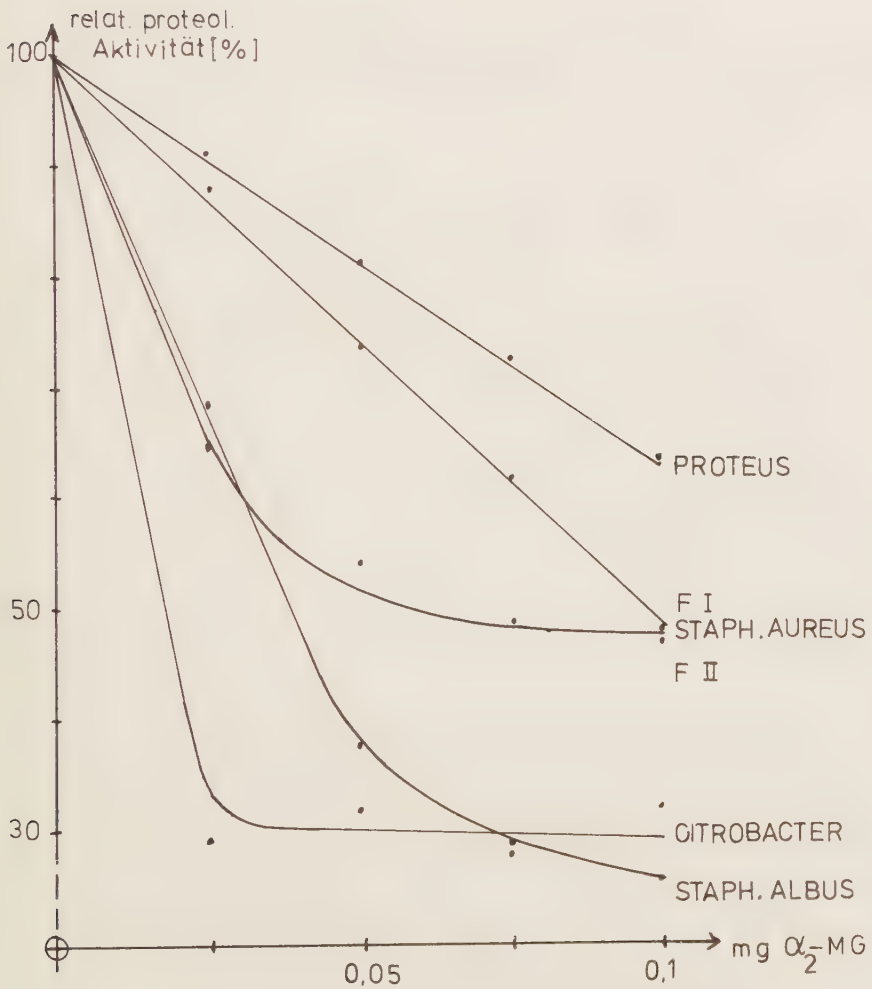


Abb. 4 : Darstellung der Hemmwirkung von α_2 - Makro-
globulin auf Bakterienproteasen.

Ovomucoid aus Eiklar mit einer trypsininhibitorischen Kapazität von 2200 ImU erzielt bei folgenden Proteasen die angegebenen Hemmwerte:

Proteasen aus :	Hemmwirkung in %:
Staphylococcus albus	42 %
Proteus mirabilis	45 %
Staphylococcus aureus haemolyticus	
Fraktion I	39 %
Fraktion II	52 %
Citrobacter intermedius	66 %

Die Hemmkurven zu diesen Endwerten sind in Abb. 5 dargestellt.

α_1 - Antitrypsin aus Humanserum und exogene Trypsin-inhibitoren aus Roggen, Sojabohnen sowie niedermolekulare Inhibitoren aus der Glandula submandibularis des Hundes und der polyvalente Inhibitor aus Rinderorganen (TRASYLOL[®]) zeigten keine Hemmwirkungen gegenüber den hier untersuchten Bakterienproteasen.

Lediglich die Proteasen aus Staphylococcus aureus haemolyticus Fraktion II scheinen andere Eigenschaften zu haben.

Sie werden durch α_1 - Antitrypsin, Hundesubmandibularis - Inhibitor und TRASYLOL[®] gehemmt und ihr pH - Optimum liegt bei pH 6 (Abb. 2).

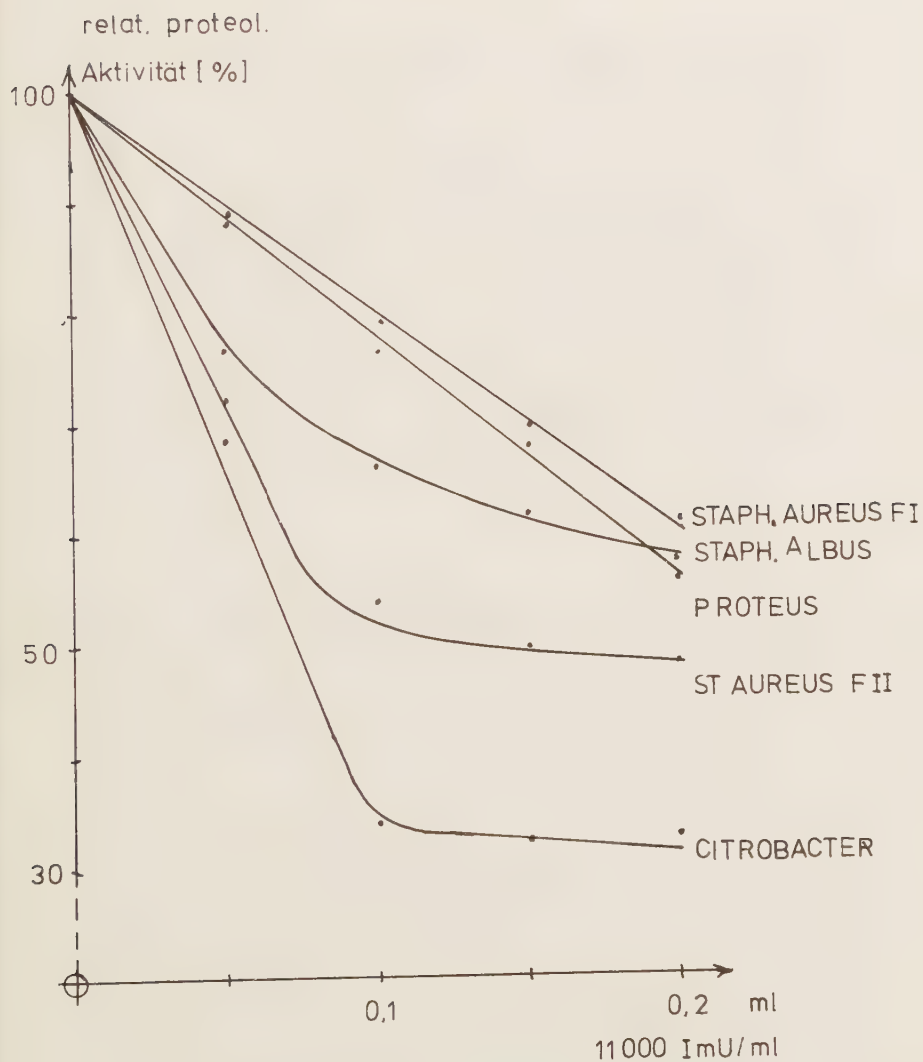


Abb. 5 : Darstellung der Hemmwirkung von Inhibitoren aus Eiklar auf Bakterienproteasen

Die Zusammenfassung zeigt die Hemmbarkeit der proteolytischen Aktivität dieser Fraktion.

Inhibitor	eingesetzte Inhibitormenge ImU	Hemmwirkung %
-----------	-----------------------------------	---------------

TRASYLOL [®]	1500 ImU	50 %
HSMI	260 ImU	21 %
α_1 - AT	260 ImU	23 %
SBI	260 ImU	10 %

Rückschlüsse aus diesen letzten Ergebnissen sollen allerdings nicht gezogen werden.

DISKUSSION

Die Ergebnisse unserer Hemmversuche bei Proteasen der Keime *Staphylococcus aureus* und *albus*, *Citrobacter intermedius* und *Proteus mirabilis* stimmen mit den Resultaten von HOCHSTRASSER et al., der die Hemmbarkeit der Proteasen aus "*Pseudomonas aeruginosa*" untersucht hat, überein. (16)

In anderem Zusammenhang berichtet auch KUEPPERS über die Hemmung von extrazellulären Proteasen aus *Staphylococcus aureus* und *Proteus mirabilis* mit α_2 -Makroglobulin und über die fehlende Hemmbarkeit durch α_1 -Antitrypsin. (21)

Die Aktivität von extrazellulären bakteriellen Proteasen der zuerst genannten Mikroorganismen wird durch spezifische Trypsininhibitoren wie α_1 -Antitrypsin, SBI, TRASYLOL[®], Trypsininhibitoren aus Roggen und der Glandula submandibularis des Hundes nicht gehemmt.

Daraus kann man schließen, daß diese Proteasen nicht trypsinartig gebaut sind.

Dies könnte entweder in einem dem Trypsin unähnlichen reaktiven Zentrum begründet sein oder durch eine von Trypsin abweichende Tertiärstruktur verursacht sein, die die Bildung eines Enzyminhibitor-Komplexes sterisch unmöglich macht.

Die relativ gute Hemmwirkung von α_2 -Makroglobulin auf die Aktivität der oben genannten Keime beruht wohl auf der von BARRETT et al. angenommenen Reaktionsweise dieses Inhibitors mit Proteasen. (1)

Es wurden folgende Beobachtungen gemacht: (2)

- Es reagieren alle Arten von Endopeptidasen (Carboxyl-, Thiol-, Serin- und Metallproteasen) mit α_2 -Makroglobulin, nicht jedoch Zymogene, Exoproteasen und nicht-proteolytische Hydrolasen.
- Das reagierende Enzym ist irreversibel an den Inhibitor gebunden.
- α_2 - Makroglobulin reagiert nur mit einem Proteasenmolekül.
- Der α_2 - Makroglobulin - Enzymkomplex ist in der Lage, kleine Substratmoleküle zu hydrolysieren, vermag aber große Moleküle nicht zu spalten.
- Das gebundene Enzym ist vor anderen Inhibitoren mit hohem Molekulargewicht geschützt, nicht jedoch vor niedermolekularen Hemmstoffen.

Auf Grund dieser Beobachtungen wird folgendes Denkmodell zum Hemmechanismus des α_2 - Makroglobulin - Moleküls vorgeschlagen:

Die Bildung des Enzym-Inhibitor-Komplexes wird durch eine "proteolytische Attacke" am α_2 - MG - Molekül eingeleitet. Dies bewirkt eine derartige Strukturveränderung, so daß das Enzymmolekül irreversibel im veränderten α_2 - Makroglobulin - Molekül eingeschlossen wird.

Die Hemmung beruht dann auf einer sterischen Behinderung des Substrats beim Zutritt an das Enzym in seiner "Falle".

Durch dieses Reaktionsmodell ist das große Hemmspektrum erklärbar.

α_2 - Makroglobulin vermag neben bakteriellen Proteasen auch Pankreasproteasen, lysosomale Kathepsine, Pilzproteasen und pflanzliche Proteasen, wie Ficin und Papain zu inaktivieren.

Die unvollständige Hemmung der übrigen Inhibitoren ergibt sich offensichtlich durch das Vorliegen eines Gemisches aus hemmbaren und nicht hemmbaren Proteasen in verschiedenen Mengenverhältnissen.

Bei den Erkrankungen des Hals - Nasen - Ohren - Bereiches, sowie des Respirationstraktes spielen proteolytische Prozesse und deren Hemmung eine bedeutende Rolle.

Diese Beobachtung wird bei der Entstehung des obstruktiven Lungenemphysems infolge hereditären α_1 - Antitrypsin - Mangels belegt. (25) (27) (28)

α_2 - Makroglobulin wird nur in sehr geringen Konzentrationen in Schleimhautsekreten gefunden. Es besitzt ein Molekulargewicht von über 800.000 und kann deshalb offensichtlich nur schwer in den extravasalen Raum gelangen.

Ein chronisch bakterieller Infekt des Respirationstraktes, der durch die Freisetzung großer Mengen von Proteasen leukozytärer, lysosomaler und bakterieller Herkunft gekennzeichnet ist, kann zu obstruktiven Veränderungen der Atemwege führen. Dies ist verständlich, da α_2 - MG auf Grund der erschwerten Membranpassage nur in geringer Konzentration vorliegt, die inhibitorische Kapazität im Sputum, beruhend auf α_1 - AT und den niedermolekularen, säurestabilen Inhibitor, geringer ist als die proteolytische Kapazität und die Empfindlichkeit der Bronchialmuskulatur durch proteolytische Enzyme des Sputums gesteigert

wird. (22) (17)

MOSKOWITZ postuliert einen extrazellulären, bakteriellen α_1 - Antitrypsin - Inaktivator von gewissen gramnegativen Keimen (26)

Dieser könnte mit den von uns untersuchten Proteasen identisch sein, welche die Wirkung des α_1 - Antitrypsin - Moleküls durch Proteolyse zu beeinträchtigen imstande wären.

YOTIS (34), FLETCHER (7) und CYBULSKA (6) sowie deren Mitarbeiter berichten von einem bakteriostatischen Effekt von Humanserum bzw. Plasma auf das Wachstum von koagulasenegativen Staphylokokken sowie anderen Keimen.

Diese Hemmsubstanz ist wasserlöslich, temperaturunempfindlich und der Globulinfraktion zuzuordnen. Setzt man dem Nährmedium jedoch hochgereinigte Koagulase zu, vermögen koagulasenegative Staphylokokken wieder zu wachsen. Es ist nicht undenkbar, daß sich hinter diesem wachstumshemmenden Faktor des Serums das α_2 - Makroglobulin verbirgt, das durch seine oben geschilderte Reaktionsweise die zur Nahrungsaufnahme nötigen bakteriellen Proteasen bindet und somit eine Vermehrung verhindert.

Gereinigte Koagulase, die der Nährlösung zugesetzt wird, könnte den Enzym - Inhibitor - Komplex derart verändern, daß die Bakterienproteasen wieder mit dem Substrat reagieren können, und somit die Voraussetzungen für ein Wachstum gegeben wären.

Um diese Hypothese zu belegen, werden allerdings noch viele Untersuchungen vorgenommen werden müssen.

In den Schüttelkulturen mancher Keime müssen Ca^{2+} - Ionen vorhanden sein, wenn extrazelluläre Proteasen gefunden werden sollen. (4)

Über dieses Kation ist viel geschrieben worden, bis sich schließlich herausstellte, daß es weder zur Synthese, Ausscheidung oder Aktivierung von Proteasen, noch als prostethische Gruppe für die enzymatische Aktivität nötig ist.

Die Funktion des Ca^{2+} - Ions ist die stabilisierende Wirkung auf das Enzymmolekül. Ca^{2+} wirkt somit als Schutzfaktor vor der Selbstverdauung der Proteasen in der Kulturflüssigkeit.

Bei unseren Versuchen wurde der Ca^{2+} - Gehalt des Kulturüberstandes nicht gemessen.

Vermutlich kann die schwache Aktivität unserer extrazellulären Proteasen auf einen Ca^{2+} - Mangel der Nährlösung zurückgeführt werden, so daß ein gewisser Teil der proteolytischen Enzyme auf Grund der Selbstverdauung nur noch als Spaltprodukt vorgelegen hat.

Z U S A M M E N F A S S U N G

Bakterielle Entzündungsabläufe werden, neben Toxinbildung der Keime, durch Menge und Beschaffenheit extrazellulär gebildeter proteolytisch wirkender Enzyme gekennzeichnet.

Als Proteasenquelle werden Kulturüberstände von *Staphylococcus aureus haemolyticus*, *Staphylococcus albus*, *Citrobacter intermedius* und *Proteus mirabilis* mit dem unspezifischen Proteasensubstrat Azokasein bei verschiedenen pH - Werten versetzt und 18 Stunden inkubiert. Als Kriterium der proteolytischen Aktivität eines Bakteriums wird die Hydrolysierbarkeit von Azokasein zugrunde gelegt.

Die unter diesen Bedingungen für jeden Keim maximale Extinktionszunahme wird als relative Enzymaktivität von 100 % bezeichnet. Das Aktivitätsoptimum der von uns untersuchten Keime liegt fast ausschließlich im physiologischen Bereich.

Die Hemmbarkeit der proteolytischen Aktivität wird an Hand verschiedener natürlicher Proteaseninhibitoren untersucht.

Die Ergebnisse zeigen, daß die von uns betrachteten bakteriellen Proteasen nicht von alpha - 1 - Antitrypsin, dem polyvalenten Inhibitor aus Rinderorganen (TRASYLOL[®]) und Inhibitoren pflanzlichen Ursprungs gehemmt werden. Humanserum hemmt die proteolytische Aktivität der bakteriellen Proteasen zum größten Teil.

Die inhibitorische Wirkung des Serums beruht auf seinem Gehalt an alpha - 2 - Makroglobulin.

Mit Ovomucoid wurde lediglich eine Teilhemmung erzielt.

Bei einigen bakteriellen Infektionen wird das Hemmsystem überfordert, da alpha - 2 - Makroglobulin wegen seines hohen Molekulargewichtes von ca. 820.000 extravasal nur in sehr geringer Konzentration anzutreffen ist.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. BARRETT, A.J., STARKE, P.M.:
The Unique Nature of the Interaction of
 α - 2 - Macroglobulin with Proteinases
in: Bayer-Symposium V "Proteinase-Inhibitor"
1974 Springer-Verlag S. 72 ff.
2. BARRETT, A.J., STARKE, P.M.:
The Interaction of α - 2 - Macroglobulin
with Proteinases
Biochem. Journal Bd. 133, 1973, 709-724
3. BIRK, Y.
Purification and some Properties of a
Highly Active Inhibitor of Trypsin and
 α - Chymotrypsin from Soybeans.
Biochim. biophys. Acta Bd. 54, 1961, 378
4. BISSELL, M., TORI, R., GORINI, L.:
Mechanism of Excretion of a Bacterial
Proteinase:
Factors Controlling Accumulation of the
Extracellular Proteinase of a Sarcina-
Strain (Coccus P)
J. Bacteriol. Bd. 105, 1971, 1099
5. BUCK, F.F., BIER, M., NORD, F.F.:
Some Properties of Human Trypsin
Arch. Biochem. Bd. 98, 1962, 528
6. CYBULSKA, J., JELJASZEWICZ, J.:
Bacteriostatic Activity of Serum Against
Staphylococci
J. Bacteriol. Bd. 91, 1966, 953

7. FLETCHER, S.:
The Growth of Staphylococci in Human Serum
J. of Path. and Bacteriol. Bd. 84, 1962,
327
8. FRITZ, H., JAUMANN, E., MEISTER, R., PASQUAY, P.,
HOCHSTRASSER, K., FINK, E.,:
Isolierung eines Inhibitors für Proteinasen
aus der Glandula submandibularis vom Hund
Proc.Int.Res.Conf. on Proteinase Inhibitors
W. de Gruyter Verlag, Berlin 1971, 275-270
9. FRITZ, H., TRAUTSCHOLD, I., WERLE, E.,:
in: Methoden der Enzymatischen Analyse
(Hrsg. Bergmeyer, H.U.) 2. Aufl. 1970
Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße
Bd. 1, S. 1221 - 1232
10. FRITZ, H., TRAUTSCHOLD, I., WERLE, E.,:
in: Methoden der Enzymatischen Analyse
(Hrsg. Bergmeyer H.U.) 2. Aufl. 1970
Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße
Bd. 1, S. 1021
11. FRITZ, H., TSCHESCHE, H., GREEN, L.J., TRUSCHKEIT, E.,:
in: Proteinase Inhibitors
Proceedings of the 2nd International
Research Conference
Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York
1974 S. 72
12. HAM, W.E., SANDSTEDT, R.M.,:
A Proteolytic Inhibiting Substance in the
Extract From Unheated Soy Bean Meal
J. biol. Chem. Bd. 154, 1944, 505
14. HOCHSTRASSER, K., FRITZ, H.,:
Die Aminosäuresequenz des doppelköpfigen
Proteinasen - Inhibitors aus der Glandula

submandibularis des Hundes
Hoppe - Seyler's Z. Physiol. Chemie
Bd. 356, 1975, 1659-1662

15. HOCHSTRASSER, K., WERLE, E.:
Isolierung eines Inhibitors aus Keimen von
Weizen und Roggen
Hoppe - Seyler's Ztschr. f. Physiol. Chemie
Bd. 350, 1969, 249-254
16. HOCHSTRASSER, K., THEOPOLD, H.M., BRANDL, O.:
Zur Hemmbarkeit der Proteinasen aus Pseudo-
monas aeruginosa durch α -2 - Makroglobu-
lin
Hoppe-Seyler's Z. f. Physiol. Chemie
Bd. 354, 1975, S. 1013-1016
17. ISLAM, M.S., RASCHE, B., VASTAG, E., ULMER, W.T.:
Empfindlichkeitssteigerung der Bronchial-
muskulatur durch proteolytische Fermente
im Sputum
Pneumonologie Bd. 146, 1971, 232-240
18. JAWETZ, E., MELNICK, J.E., ADELBERG, E.A.:
Medizinische Mikrobiologie
Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York
1968, S. 382 ff.
19. KLEINE, D.L., FISHMANN, J.B.:
Proactivator Function of Human Plasmin as
Shown by Lysin Esterase Assay
J. biol. Chem. Bd. 236, 1961, 2807
20. KORTEKANGAS, A.E.:
Investigations of the Bacterial Flora of
the Respiratory Tract
Acta Oto Laryngologica Supplem. 150, 1959

21. KUEPPERS, F., BEARN, A.G.:
A Possible Approach to the Association of
Hereditary α -1-Antitrypsin Deficiency and
Pulmonary Emphysema
Proc. Soc. exp. Biol. Bd. 121, 1966, 1207-
1209
22. LIEBERMANN, J., GAWALD, M.A.:
Inhibitors and Activators of Leucocytic
Proteases in Purulent Sputum. Digestion of
Human Lung and Inhibition by α -1-Antitrypsin
J. Lab. Clin. Med. Bd. 77, 1971, 713-727
23. LINEWEAVER, H., MURRAY, C.W.:
Identification of the Trypsin Inhibitor of
Egg White with Ovomucoid
J. biol. Chem. Bd. 171, 1947, 565
24. MATSUSHIMA, K.:
An Undescribed Trypsin Inhibitor in
Egg White
Science, Bd. 127, 1958, 1178
25. MITTMAN, C.:
Pulmonary Emphysema and Proteolysis
Academic Press New York and London 1972
26. MOSKOWITZ, R.W., HEINRICH, G.:
Bacterial Interaction of Human Serum
 α -1-Antitrypsin
J. Lab. Clin. Med. Bd. 77, 1971, 777-785
27. REICHERT, R., HOCHSTRASSER, K.:
Veränderungen des Proteaseninhibitorspie-
gels im menschlichen Nasensekret im Ver-
lauf verschiedener Rhinopathien
Ztschr. f. Laryngol. Rhinol.
Bd. 51, 1972, 73-80

28. REICHERT, R., HOCHSTRASSER, K., CONRADI, G.:
Untersuchungen zur Proteasenhemmkapazität
des menschlichen Bronchialsekrets
Pneumonologie, Springer Verlag Bd. 147,
1972, 41-45
29. RHODES, M.B., AZARI, P.R., FEENEY, R.E.:
Analysis, Fractionation and Purification
of Egg White Proteins with Cellulose-
Cation Exchanger
J. biol. Chem. Bd. 230, 1958, 399
30. RYAN, J.W., CLARY, J. TOMIMATSU, Y.:
Chicken Chymotrypsin and Turkey Trypsin
Part II: Physical and Enzymatic Properties
Arch. Biochem. Bd. 98, 1965, 175
31. STEVENS, F.C., FEENEY, R.E.:
Chemical Modifications of Avian Ovomucoids
Biochemistry, Bd. 2, 1963, 1346
32. STRÄSSLE, R.:
Antifibrinolyse
Schweiz. med. Wschr. Bd. 90, 1960, 1249
33. VOGEL, R., TRAUTSCHOLD, I., WERLE, E.:
Natürliche Proteinase Inhibitoren
Thieme Verlag Stuttgart 1966
34. YOTIS, W., EKSTEDT, R.:
Studies on Staphylococci
Part III: Further Studies on Purification
and Mechanism of Action of an Antibacterial
Human Serum Factor
J. of Bacteriol. Bd. 80, 1960, 719

LEBENS LAUF

Am 30. April 1949 wurde ich, Hermann Wunderlich, in München als Sohn des Dipl. Ing. Hermann Wunderlich und seiner Frau Charlotte, geb. Vogt, geboren.

Im Herbst 1955 trat ich in die Volksschule zu Pullach ein. Nach vierjährigem Besuch wechselte ich im Herbst 1959 an das Neue Realgymnasium in München. Im Juni 1970 legte ich die Reifeprüfung am Theresiengymnasium in München ab, dessen neusprachlichen Zweig ich seit Herbst 1964 besuchte.

Zu Beginn des Wintersemesters 1970 / 71 trat ich an der Ludwig-Maximilians-Universität in München das Studium der Zahnmedizin an.

Der naturwissenschaftlichen Vorprüfung unterzog ich mich nach dem Sommersemester 1971 und der zahnärztlichen Vorprüfung nach dem Wintersemester 1972 / 73.

Vom 26. Februar 1976 bis 23. Juli 1976 legte ich das zahnmedizinische Staatsexamen an der Ludwig-Maximilians-Universität in München ab.

Seit dem 9. September 1976 bin ich als Sanitätsoffizier bei der Bundeswehr tätig.

Herrn Prof. Dr. K. Hochstrasser, Leiter des Biochemischen Laboratoriums der Hals-Nasen-Ohrenklinik der Universität München, bin ich zu großem Dank verpflichtet für seine Hilfe und Führung bei der Ausführung dieser Arbeit und das Überlassen eines Arbeitsplatzes seines Laboratoriums.

Ebenso schulde ich Dank Herrn Dr. H.M. Theopold und Herrn Priv.-Doz. Dr. G. Bretzel für die Stellung des Themas und die freundliche Unterstützung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. H.H. Naumann, Direktor der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenleiden an der Universität München, danke ich für die Arbeitsmöglichkeit in seiner Klinik.

Herrn Priv.-Doz. Dr. Bauernfeind vom Max-von-Pettenkofer-Institut für Hygiene und medizinische Mikrobiologie danke ich für die Unterstützung bei den Bakterien-Züchtungsversuchen.

Schließlich möchte ich es nicht versäumen, auch Frau Heindl und Frl. Lempart für ihre freundliche Assistenz bei der Durchführung der Experimente und Frl. Ohmann für ihre wertvolle Schreibhilfe zu danken.

